

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

OPTIMIZACION DEL CRECIMIENTO Y  
DE LA PRODUCCION DE SARSASA-  
POGENINA EN CULTIVO DE CELU-  
LAS DE YUCCA FILIFERA.

T E S I S

FERNANDO ZAMUDIO ZUÑIGA

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO.

MEXICO, D. F.

1 9 8 2.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## C O N T E N I D O

- I.       INTRODUCCION  
  
          GENERALIDADES  
  
          ANTECEDENTES Y OBJETIVOS
  
- II.       PARTE EXPERIMENTAL  
  
          REACTIVOS  
  
          SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO  
  
          METODOLOGIA
  
- III.      DISCUSION Y RESULTADOS
  
- IV.      CONCLUSIONES
  
- V.       BIBLIOGRAFIA

I N T R O D U C C I O N

A. GENERALIDADES .

Dado el desarrollo que ha tenido la técnica de cultivo de tejidos vegetales enfocados a la producción de compuestos secundarios, se ha logrado la obtención a nivel industrial de muchos compuestos de importancia, entre ellos los esteroides (Chaturvedi, H. E. y col 1976 ), (Jain, S.C. 1976 ), (Marshall, Jo. y col' 1976), alcaloides ( Chan, W. N. y col. 1964), lípidos (Stoller, E.W. 1974), (Stumpf, B. K. y col. 1977), etc.

El uso de ésta técnica ha sido aplicada principalmente - para aquellas especies cuyas características ecológicas hacen difícil su desarrollo, de ésta forma se obtiene material vegetal independientemente de las condiciones climáticas. A éste respecto las ventajas que ofrece el cultivo de tejidos son :

1. Producir bajo condiciones experimentales controladas, compuestos útiles, independientemente de cambios climáticos, ataque de plagas o condiciones del suelo.

2. Los cultivos de tejidos se obtienen libres de microorganismos.

3. Las células de cualquier planta, pueden ser susceptibles de ser multiplicadas para producir sus metabolitos específicos.

4. En el estudio de la obtención de productos secundarios está implícita la necesidad de establecer investigaciones a nivel básico del metabolismo relacionado con el producto secundario estudiado, lo cual conduce sin duda a conocer más el sistema celular y la regulación sobre la producción del metabolito.

En base a ésto se piensa que el control automatizado del crecimiento celular, y la regulación de sus procesos metabólicos contribuirían a la reducción del costo de la producción.

5. Es posible obtener mutantes de células vegetales con el objetivo de producir células altamente productoras de un metabolito dado.

Se sabe que la mayor parte de los cultivos producen cantidades pequeñas del compuesto secundario, sin embargo en -- éstos cultivos existen algunas células que mantienen todo el potencial bioquímico de su síntesis, de manera similar al de las células de la planta completa.

Se han realizado experimentos en colonias de Catharanthus roseus, en las cuales se han analizado en cada colonia el contenido de alcaloides, ajmalicina y serpentina (Yoshikawa, K., y col.1973). Los resultados mostraron que existía una gran variación del contenido de éstos compuestos en las diferentes colonias, lo que sugiere que aislando colonias altamente productoras de compuestos secundarios, es factible contar con -- líneas celulares sobreproductoras.

La forma como se puede hacer el análisis es de la siguiente manera:

- a) Radioinmunoensayo
- b) Colonias coloridas
- c) Técnica de Squash

Debido a éstas características de las células vegetales la exploración de las capacidades biosintéticas de varios - cultivos de células ha sido analizada por grupos de investigadores de plantas y microorganismos en varios países durante la década pasada.

Los resultados obtenidos por éstos investigadores no -- fueron siempre satisfactorios en relación a los contenidos de compuestos específicos, sin embargo durante los últimos años, hallazgos importantes han reportado una gran variedad de sustancias de interés médico, algunas de las cuales pueden ser producidas en escala industrial en un futuro cercano. Un -- ejemplo es la utilización de la sapogenina diosgenina como ma-  
teria prima para la producción de una gran variedad de hormo-  
nas esteroidales de uso farmacéutico ( Stohs, S.J., y col.1969) Misawa y col. 1975, llevaron a cabo un extenso análisis de -- sustancias que tuvieran uso farmacológico, utilizando la téc-  
nica de cultivo de tejidos encontrando por ejemplo, que célu-  
las secas de un cultivo en suspensión de Vinca rosea resultó ser efectivo contra la infección de pollos con Coccidium -- (protozoario que produce la enfermedad llamada coccidiosis, que afecta principalmente a gallinas). (Barz, W., 1977).

Es importante hacer notar que las células que constituyen el cultivo desdiferenciado son totipotenciales, su material genético no se pierde, sólo se reprime temporalmente, sin -- embargo en muchos casos se ha observado que la producción de compuestos secundarios se ve disminuída en los cultivos de te-  
jidos, lo que asegura que la producción de muchos metabolitos secundarios se encuentra relacionados o asociado a ciertas -- partes diferenciadas de los cultivos.

## FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCION DE COMPUESTOS

## SECUNDARIOS.

La producción eficiente de los metabolitos secundarios en cultivo de células vegetales depende en gran parte del medio ambiente en que se encuentran y a diversos factores biológicos, mismos que podríamos enumerarlos de la siguiente forma:

## 1) Factores ambientales:

Uno de los factores físicos más estudiado es el efecto de la luz sobre la producción de compuestos secundarios. Existen metabolitos secundarios que únicamente son sintetizados en presencia de luz, mientras que otros no son influenciados significativamente por ésta durante su síntesis. Se han reportado en la literatura varios casos en los cuales la luz tiene una influencia importante en el crecimiento del tejido y la producción del compuesto secundario; por ejemplo: los callos de Mellotus japonicus acumulan un pigmento rojo (antocianinas) cuando son cultivados sobre medio L5 con 2,4-D bajo condiciones de luz blanca ( 3000 lux ) (Mitsuoka and Nishi, 1974), cultivos de Haplopappus gracilis crecidos en presencia de luz azul, verde, roja y blanca, se encontró que la síntesis de antocianinas se aumenta por la luz azul en los primeros días de incubación , mientras que con luz verde o roja la síntesis se ve disminuída ( Constabel, F., y col. 1971) ( Stickland y Suderland 1972). Otro ejemplo es la producción de ácido clorogénico en cultivo de callos de Haplopappus gracilis; la producción de éste compuesto fué incrementada por efecto de la luz blanca. azul y roja, siendo la más efectiva la luz azul (Stickland y Sunderland, 1972 ).



### 1.1) Efecto de los reguladores químicos del crecimiento.

Estos compuesto que actuan como hormonas vegetales y influencian la diferenciación de las plantas, influyen en la producción de matabolitos secundarios en cultivos de células, ésto último dependerá del tipo de metabolito de que se trate, por ejemplo, la auxina sintética ácido 2,4-dicloro fenoxiacético estimula la producción de la diosgenina ( Kaul y col.1969), el mecanismo bioquímico del control hormonal para la síntesis de nicotina fué descubierto por Mizusaki y col. 1971, habiendo demostrado que cuando la auxina se encuentra en concentraciones altas se inhibe la actividad de la enzima N-metilputrescina transferasa que cataliza la N-metilación de la putrescina la cuál es un intermedio clave en la biosíntesis de nicotina.

Otro ejemplo se puede citar es el que se refiere a la producción de diosgenina en cultivos de callos de Dioscorea deltoidea, en la que se observa que cuando se crecen éstos -- cultivos en ausencia de 2,4-D por períodos de 11 semanas después de haber estado presente la auxina 2,4-D en proporción de 1 ppm, se aumenta de 1 a 3 veces las cantidades de diosgenina normalmente presente. (Stohs, S.J. 1975).

#### 1.1.1.) Efecto de los precursores:

La administración exógena de un precursor biosintético al medio de cultivo, puede incrementar la síntesis del producto final.

La administración de un precursor directo no es necesariamente efectivo para incrementar la producción final. A pesar de la existencia de muchos ejemplos que demuestran lo anterior no es fácil encontrar el precursor más efectivo para incrementar el contenido del producto final, así podemos ver

que cuando se adiciona colesterol de manera apropiada a los cultivos en suspensión de Dioscorea deltoidea se eleva la producción de diosgenina en un 250%, con respecto a cultivos en ausencia de colesterol, pues el contenido de diosgenina es de 2.5% contra 1% respectivamente. (Kaul, B., Stohs S.J. 1969).

#### 1.V) Efecto de los nutrientes.

En relación con éste aspecto se han hecho aún pocos estudios sobre los efectos de componentes del medio de cultivo. Los estudios efectuados al presente son principalmente aquellos en los que se ve únicamente el efecto de determinado elemento en el crecimiento y desdiferenciación del cultivo. Se sabe por ejemplo, que un componente muy importante para la obtención de cultivos desdiferenciados provenientes de cereales es el extracto de levadura, hidrolizado de caseína o agua de coco (Reinert, J. 1977).

#### V.) Controles Biológicos.

La actividad biosintética de un cultivo de células usualmente varía con el crecimiento celular o con la utilización del substrato. Estudios cinéticos de la relación entre el crecimiento celular y la formación del producto secundario son esenciales para un entendimiento básico de la producción de compuesto secundarios.

En realidad se conoce poco acerca de la interrelación entre el incremento en la producción de un compuesto y la edad de las células individuales de un cultivo de células vegetales. Sin embargo datos experimentales sobre la relación que existe entre el tiempo de crecimiento y la formación del producto indican que los patrones, producción-crecimiento pueden ser clasificados en tres tipos:

1. La síntesis del producto se lleva a cabo casi paralelamente al crecimiento celular, la máxima producción se observa en la fase logarítmica del crecimiento del cultivo ( Song and Tattrie, 1973).

2. En el segundo tipo, la formación del producto es difásica como en el caso de la producción de diosgenina - (Kaul y col. 1969).

3. En el tercer tipo, la curva de producción es difásica como en el caso de la producción de diosgenina ( Kaul y col. 1969)

Vl.) Diferenciación celular.

Otro factor biológico que determina la producción de los metabolitos secundarios es la diferenciación celular.

En plantas superiores existen ciertos compuestos, los - cuales son sintetizados o acumulados únicamente en un órgano o tejido específico. En el caso de cultivos de células se

han observado algunos ejemplos en los cuales al inducir la diferenciación celular, también se induce la producción del compuesto deseado.

Existe también el caso en el cual cuando se induce la desdiferenciación celular a partir de un tejido altamente productor del compuesto deseado se obtiene igual o más alta producción del mismo en los cultivos. (Tabata y col. 1971).

De acuerdo a todo lo anterior se puede apreciar que - los factores que afectan la producción de compuestos secundarios en un cultivo de células vegetales son muchos por lo que es difícil precisar si un compuesto se obtendrá con - - éxito, de la misma forma es importante hacer notar que las condiciones óptimas para la producción de un determinado metabolito secundario serán específicas para ese metabolito, es decir, no se pueden generalizar las condiciones de cultivo para la obtención de productos secundarios.

B.) A N T E C E D E N T E S   Y   O B J E T I V O .

En México existe una planta del género Yucca, la cual se localiza principalmente en los estados de San Luis Potosí, Coahuila, Nuevo León y Zacatecas. Esta planta constituye una industria importante desde el punto de vista económico, se aprovecha como materia prima para la fabricación de asientos, cordeles, sogas, etc. El fruto es una fuente de alimentación en general pues se le puede utilizar como complemento en concentrado alimenticio para animales, por contener apreciables cantidades de carbohidratos, proteínas y grasas.

Romo de Vivar y Col. ( 1974 ), encontraron en diferentes partes de la planta ( hoja, tallo y semilla ), una variación en el contenido de sarsasapogenina, encontrándose la mayor producción , aproximadamente 8%, de éste compuesto en semilla madura.

La sarsasapogenina esteroidal que puede ser utilizada como materia prima para la preparación de productos con actividad fisiológica, que son usados en la industria farmacéutica, tales como hormonas sexuales, corticoides, anticonceptivos, etc.

Se sabe que una de las características de la planta -- Y. filifera es su lento crecimiento y que puede tardar en florecer por primera vez entre 15, 30 y hasta 50 años, además existen problemas con su polinización, ésta se efectúa a través de un insecto llamado Pronuba yucasella (Murguía, A.F. 1959), el cuál se encuentra en vías de extinción.

En un trabajo previo ( Rosas, V. 1979 ), indujo la formación de un cultivo de células de Yucca filifera en diferentes medios de cultivo a partir de hojas y coleoptilo, habiendo detectado sarsasapogenina en éstos cultivos por el método de cromatografía en capa fina; el aspecto del tejido obtenido mostraba partes ligeramentes diferenciadas, tenía un crecimiento lento y un alto contenido de aceites.

En base a lo anteriormente descrito, el objetivo del presente trabajo fué :

1. Optimizar el crecimiento de los cultivos de células de Yucca filifera, así como también tratar de incrementar la producción de sarsasapogenina en los mismos. Para llevar a cabo la optimización del crecimiento, se plantea la utilización de compuestos enriquecedores del medio de cultivo, - tales como el hidrolizado de caseína ó extracto de levadura, y/o selección de colonias con buen crecimiento.

Para tratar de incrementar la producción de sarsasapogenina se piensa utilizar un compuesto que por su estructura - pudiera actuar como precursor de la síntesis de sarsasapogenina. (Fig. 1).

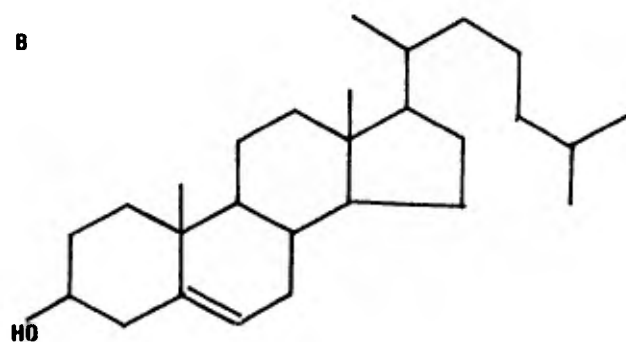
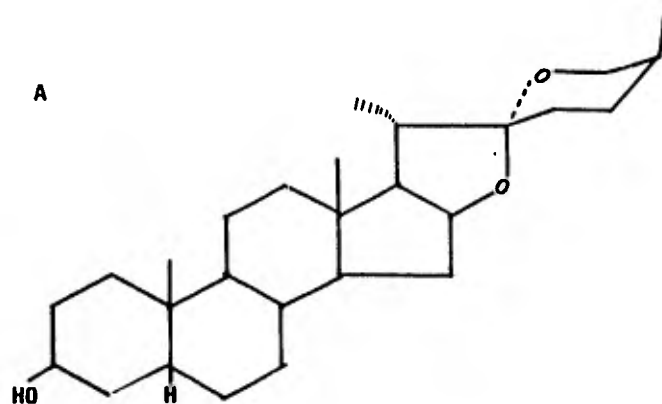


FIG. 1. Estructura de las moléculas de: a) Sarsasapogenina  
b) Colesterol.

PARTE EXPERIMENTAL



I I. P A R T E E X P E R I M E N T A L

R E A C T I V O S :

Acido 1-Naftalen Acético (ANA)	( BDH Laboratory Reagents)
Acido 2,4-Dicloro Fenoxiacético (2,4-D)	( Merck )
6-Bencial Amino Purina ( BA )	( Sigma )
Hexano	(J.T. Baker)
Chromosorb WHP	
Fasé líquida : OV - 101	3%
Detergente extran MAO3 (exento de fosfatos)	(Merck)
Sacarosa	(J.T. Baker)
Acido Clorhídrico	(Merck)
Hidróxido de Sodio	(Merck)
Cromatoplacas de Silica Gel 60 <sup>f</sup> 254	(Merck)

Todas las sales inorgánicas utilizadas fueron grado R.A.

Soluciones y medios de cultivo:

Solución 1:	Gramos
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> . . . . .	16.5
KNO <sub>3</sub> . . . . .	19.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	1.7
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O . . . . .	3.7
H <sub>2</sub> O c.b.p. . . . .	1000 ml

## Solución 2:

Gramos

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	11.0
$\text{H}_2\text{O}$ c.b.p. . . . .	250 ml

## Solución 3:

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	0.695
EDTA $\text{Na}_2$ . . . . .	0.9325
$\text{H}_2\text{O}$ c.b.p. . . . .	250 ml

## Solución 4:

$\text{H}_3\text{BO}_3$ . . . . .	0.155
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	0.5575
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	0.2075
KI . . . . .	0.0207
Stock A . . . . .	2.5 ml
$\text{H}_2\text{O}$ c.b.p. . . . .	250 ml

## Solución 5:

	Gramos
Glicina . . . . .	0.05
Inositol . . . . .	2.5
Ac. Nicotínico . . . . .	0.0125
Piridoxina-HCL . . . . .	0.0125
Tiamina . . . . .	0.0025
H <sub>2</sub> O c.b.p. . . . .	250 ml

## Stock A :

NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O . . . . .	0.525
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O . . . . .	0.0525
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O . . . . .	0.0525
H <sub>2</sub> O c.b.p. . . . .	200 ml

### Medios de Cultivo:

---

En los medios de cultivo empleados en éste trabajo se usó como medio basal el de Murashige y Skoog, (Murashige 1962), el cual se preparó agregando a un matraz de 1,000ml lo siguiente:

Solución 1 . . . . .	100 ml
Solución 2 . . . . .	10 "
Solución 3 . . . . .	10 "
Solución 4 . . . . .	10 "
Solución 5 . . . . .	10 "
Sacarosa . . . . .	30 g
se ajusta el pH a 5.8	

Medios de cultivo utilizados para la inducción y propagación de callos de Yucca filifera.

Medio de Cultivo:	Auxina	Citocinina
ANA <sub>5</sub> BA <sub>9</sub>	ANA 1x10 <sup>-5</sup> M	BA 1 x 10 <sup>-9</sup> M
ANA <sub>5</sub> BA <sub>9</sub> C	ANA 1x10 <sup>-5</sup> M	BA 1 x 10 <sup>-9</sup> M + Colesterol 0.02%
ANA <sub>5</sub> BA <sub>9</sub> HC	ANA 1x10 <sup>-5</sup> M	BA 1 x 10 <sup>-9</sup> M + Hidrolizado de caseína ( 0.5, 1 y 2.0 % )
ANA <sub>5</sub> BA <sub>9</sub> EL	ANA 1x10 <sup>-5</sup> M	BA 1 x 10 <sup>-9</sup> M + Extracto de Levadura ( 0.5, 1.0 y 2.0 % ).

ANA - - Acido Naftalén Acético

BA - - 6- bencil amino purina

## M E T O D O L O G I A

### ESTERILIZACION DE SEMILLAS:

Las semillas que se van a esterilizar se lavan con alcohol al 70% durante 30 segundos con el objeto de quitarles las grasas y ceras, enseguida se lavan con agua destilada estéril 2 o 3 veces y se colocan en una solución de hipoclorito de calcio al 10% conteniendo detergente extrán líquido al 1%, se dejan en contacto con ésta solución durante 20 minutos, se elimina la solución anterior por decantación y se lavan las semillas repetidas veces hasta eliminar completamente el hipoclorito de calcio.

Todas las manipulaciones deberán hacerse dentro de una campana en condiciones de esterilidad.

### INDUCCION DE CALLOS A PARTIR DE SEMILLA MADURA DE YUCCA FILIFERA:

Las semillas maduras esterilizadas se colocan en lotes de 8 a 10 semillas en frascos conteniendo 30 ml. de medio de cultivo  $ANA_5BA_9$  y se incuban en presencia de luz blanca (1300 lux) a 28°C, durante aproximadamente 20 días.

También se colocaron de la misma forma semillas en frascos conteniendo 30 ml. de medio de cultivo enriquecido con hidrolizado de caseína. Se probaron varias concentraciones (0.1%, 0.2% y 0.5%).

Así mismo se colocaron semillas en frascos conteniendo 30 ml. de medio de cultivo enriquecido con extracto de levadura, en las mismas concentraciones que el compuesto anterior.

#### OBTENCION DE UN CULTIVO EN SUSPENSION:

Se toma una porción de células provenientes de un cultivo - crecido en el medio ANA<sub>5</sub>BA<sub>9</sub> sólido, el cuál tenía 20 resiemb- bras, a la fase estacionaria, son transferidas a un matraz conteniendo el mismo medio anterior pero sin agar, los matra- ces se colocan en agitación durante 22 días a temperatura - ambiente. Después de éste tiempo de incubación se toman - 10 ml. de paquete celular ( el paquete celular se obtiene centrifugando a 3,000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se desecha ) y se inoculan matraces conteniendo 50 ml. de - nuevo medio de cultivo.

## SELECCION DE CELULAS DE CRECIMIENTO RAPIDO POR PLAQUETO EN

## CAJAS PETRI.

Se preparan cajas de petri de 15 cm. de diámetro conteniendo el medio sólido ANA<sub>5</sub>BA<sub>9</sub> estéril, se les agrega 1.0ml de células provenientes de un cultivo en suspensión, que se encuentra en fase estacionaria de crecimiento, y se dispersan por medio de una varilla de vidrio doblada estéril y por último, se sellan las cajas para evitar pérdidas de agua.

Después de 12 semanas de incubación a 28°C se observó la formación de colonias suficientemente grandes, habiéndose seleccionado aquellas cuyo crecimiento fué más rápido y - - transferiéndolas a frascos conteniendo 30 ml. de nuevo medio de cultivo para su propagación.

## PROPAGACION DE LAS CELULAS :

Los callos así obtenidos por medio del plaqueo celular, se colocaron bajo diferentes condiciones de incubación, unos en luz roja y otros en luz blanca, ambos a 28°C, el tiempo de incubación fué de 22 días. Después de éste tiempo se transfieren las células a frascos conteniendo nuevo medio de cultivo.

Es importante hacer notar que siempre que se transfiere el cultivo después de haber cumplido los 22 días de crecimiento se hace nuevamente una selección de los cultivos que tienen mejor aspecto, textura y grado de desdiferenciación, eliminando las partes oscuras debidas probablemente a la producción de compuestos fenólicos.

#### OBTENCION DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO CELULAR:

Se inoculan con 3.0 grs. de tejido desdiferenciado 35 - frascos conteniendo 30 ml. de medio de cultivo ANA<sub>5</sub>BA<sub>9</sub> cada uno; se utilizan 5 frascos para determinar peso fresco y peso seco en cada uno de los tiempos que se seleccionaron: 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 días; para determinar el peso fresco o el peso seco que corresponde a cada tiempo de incubación, se saca el promedio de las 5 determinaciones.

Así mismo, se determinó la curva de crecimiento celular a células crecidas en medio de cultivo ANA<sub>5</sub>BA<sub>9</sub> más colesterol al 0.02%.

El tejido que se utilizó para la determinación de las - curvas de crecimiento fué el mantenido durante 40 re- - siembras bajo condiciones de luz roja y a 28°C.

#### EXTRACCION DE SASASAPOGENINA A PARTIR DE CALLOS DE YUCCA FILIFERA:

Se puede decir que la extracción del producto consta de 3 pasos principales:

- a) Extracción de los aceites y grasas ( Fracción I)
- b) Hidrólisis ácida.
- c) Extracción de la sarsasapogenina ( Fracción II ).



La extracción de los aceites y grasas de la muestra se lleva a cabo de la siguiente manera:

Se coloca 2.0 grs. de tejido seco y pulverizado en un matraz de bola de 50ml., se agrega hexano hasta alcanzar a cubrir la muestra y se deja a reflujo durante 1 hora, enseguida se separa el hexano por filtración, se concentra a sequedad al filtrado en un vial pequeño previamente pesado y se guarda.

La muestra se vuelve a poner a reflujo con un nuevo volumen de hexano y se repite el proceso de 7 a 10 veces hasta eliminar completamente los aceites de la muestra. Para verificar ésto último se toma una pequeña muestra con un capilar del último extracto hexánico obtenido y se corre en una placa cromatográfica de gel de sílice de 5 cm. de largo por 3 cm. de ancho, utilizando como eluyente una mezcla de benceno-acetato de etilo ( 9:1 ), se revela con una solución de sulfato cérico al 2% en ácido sulfúrico al 20%, en caso de que aparezcan manchas correspondientes a aceites se continuarán las extracciones hexánicas hasta que éstas no aparezcan en la cromatoplaça ( fig. 2).

Por último, se reúnen todos los filtrados obtenidos y se concentran en el vial mencionada y por diferencia de pesos se determina la cantidad de aceites en la muestra.

#### b) Hidrólisis ácida:

Al residuo desengrasado y seco se le agrega HCl al 18% v/v hasta cubrir la muestra dejándose en un baño de vapor - durante 5 hrs., después de las cuales se filtra, lavando con agua destilada para eliminar la mayor parte de ácido, por último se neutraliza con una solución de NaOH al 5% remanente. El sedimento se deja secando durante 24 horas.

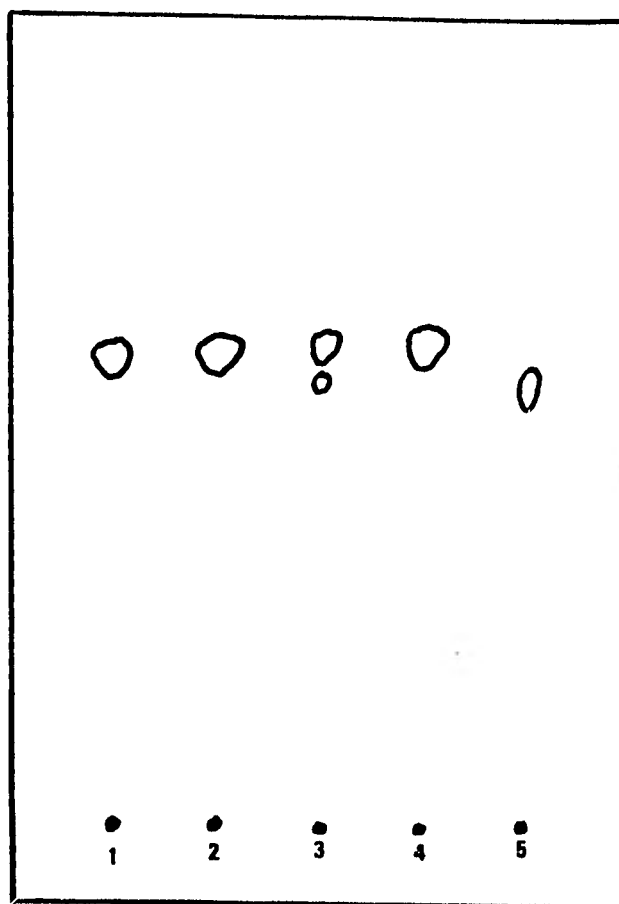


Fig. 2. Extractos hexánicos antes de hidrólisis corridos por cromatografía en capa fina.

1. Tejido crecido en medio ANA<sub>5</sub>BA<sub>9</sub>
2. Tejido crecido en medio ANA<sub>5</sub>BA<sub>9</sub> más colesterol
3. Mezcla de colesterol y sarsasapogenina
4. Colesterol
5. Sarsasapogenina.

c) Extracción de la sarsasapogenina. ( Fracc. II )

Al sedimento seco se le agrega hexano hasta cubrirlo, poniéndose nuevamente a reflujo en un matraz de 50ml. durante una hora, después de éste tiempo se filtra y se coloca el filtrado en un vial pequeño previamente pesado y se concentra a sequedad. Se llevan a cabo de 7 a 10 extracciones hexánicas más; los filtrados se reúnen y se concentran en el vial anterior, por diferencia de pesos se conoce el peso de la muestra de sarsasapogenina, que se cuantificará por cromatografía de gases.

CONTROLES UTILIZADOS EN LA EXTRACCION DE SARSASAPOGENINA:

Se utilizaron dos controles :

1. Para conocer el porcentaje de recuperación de la sarsasapogenina y,
2. Para verificar la eficiencia de nuestro método de extracción.

Para conocer el porcentaje de recuperación, se utilizó tejido desdiferenciado de jitomate el cual fué extraído 7 veces con hexano, enseguida se dividió en dos partes: a) 2 gramos se trataron siguiendo la técnica de hidrólisis y pasos subsecuentes de la extracción mencionados anteriormente, y b) a los otros 2 grs., se les agregó sarsasapogenina ( peso conocido ) y se continuó la extracción igual que la muestra anterior.

El segundo control se realizó utilizando semilla molida de Yucca filifera, siguiendo exactamente el mismo tratamiento que se le hizo a la muestra de tejido desdiferenciado de Y. filifera.

#### CUANTIFICACION DE LA SARSASAPOGENINA POR CROMATOGRAFIA DE GASES:

El residuo obtenido en el frasco vial después de haber concentrado los extractos hexánicos, se resuspendió en 500 microlitros de cloroformo y de ésta suspensión se tomaron - 2.0 microlitos para ser inyectados en el cromatografo bajo las siguientes condiciones de trabajo:

Cromatografo : Varian Aerograph CV 2100

#### Columna:

- Fase líquida : OV 101
- Soporte : Chromosorb WHP 100/120 mallas
- Longitud : 3 pies
- Diámetro : 1/8 pulgada.

Detector: Ionizador de flama

#### Temperatura:

- Detector : 260°C
- Columna : 250°C
- Inyector : 260°C

Flujo N<sub>2</sub>: 30 ml/min.

Velocidad de carta: 0.25 pulg/min.

Atenuación:  $2 \times 10^{-10}$

DISCUSION Y RESULTADOS.

## INDUCCION DE CALLOS A PARTIR DE SEMILLA MADURA DE YUCCA

## FILIFERA.

Se partió de 25 frascos que fueron inoculados con las semillas esterilizadas, mismas que germinaron e iniciaron su desdiferenciación en un tiempo aproximado de 15 a 20 días. A los 30 días se transfieren sólo las partes desdiferenciadas a un nuevo medio de cultivo, de la manera como se mencionó en la metodología.

De ésta transferencia del cultivo se obtienen 15 y 20 frascos conteniendo tejido de aspecto heterogéneo, color amarillento verdoso y de textura dura; después de 2 resiembras más las características del tejido cambian, volviéndose más desdiferenciado y suave, de aspecto aceitoso, color amarillento y cuyo crecimiento en general es lento.

De éstos resultados se pudo observar que cuando el tejido es joven tiene una textura dura y tendencia a diferenciarse a raíz. Cuando el cultivo tiene entre 15 y 20 resiembras el tejido es bastante heterogéneo y su contenido de aceites es alto, su crecimiento es lento, también se pudo observar la aparición de partes oscuras en el cultivo, esto puede deberse a la producción de compuestos fenólicos.

## EFECTO DEL EXTRACTO DE LEVADURA E HIDROLIZADO DE CASEINA:

Con el objetivo de obtener un mejor cultivo en cuanto a aspecto y crecimiento se refiere, se procedió a enriquecer el medio de cultivo con extracto de lavadura, o hidrolizado de caseína, esto fué hecho basándose en los resultados reportados.

previamente en la literatura sobre el cultivo de tejidos de cereales ( Yamada, Y. 1977), en los cuales se utiliza extracto de levadura ó hidrolizado de caseína para la obtención de tejido desdiferenciado, por ejemplo estudios realizados en cultivo de tejidos de arroz, usando para la inducción del callo nódulos de la raíz, se enfatizó en el hecho de que el - extracto de levadura fué un factor esencial para la inducción del callo ( Reinert J. y Col. 1977).

Los resultados obtenidos en el laboratorio en nuestras condiciones de trabajo, para la obtención de un mejor cultivo de células de Yucca filifera, fueron los siguientes:

a) Extracto de levadura ( ANA<sub>5</sub>BA<sub>9</sub> EL )

Se probaron 3 diferentes concentraciones del extracto de levadura : 0.1, 0.2 y 0.5% habiéndose observado en los tres casos la producción de un cultivo de aspecto amarillento en la primera fase, posteriormente se oscurecía y moría en los primeros 22 días de incubación.

b) Hidrolizado de caseína ( ANA<sub>5</sub>BA<sub>9</sub>HC )

Se probaron también 3 concentraciones diferentes de éste compuesto : 0.1, 0.2 y 0.5% resultando un cultivo de aspecto amarillo claro que lograba mantenerse durante tres resiembras y que posteriormente moría.

Dado que con el hidrolizado de caseína y el extracto de levadura no se logró obtener un buen cultivo ( desdiferenciado, homogéneo y de un buen crecimiento ), se optó por hacer una selección de las colonias que crecían favorablemente.

A partir de un fragmento de cultivo crecido en medio sólido de 20 resiembras, se inició un cultivo de células en - suspensión después de hacer cumplido 3 ciclos de crecimiento

éstas células fueron utilizadas exclusivamente para llevar a cabo el plaqueo y poder seleccionar aquellas colonias que consideramos más crecidas.

#### PLAQUEO CELULAR Y PROPAGACION DE LOS CALLOS:

Por medio de éste método se logró obtener dos tipos de colonias : 1. ) colonias de aspecto aceitoso, color amarillento y de crecimiento lento y 2) colonias de aspecto suave, quebradizo, color amarillo claro y cuyo crecimiento es más rápido que las primeras.

Se seleccionaron para su propagación el segundo tipo de colonias propagándose un lote en luz blanca ( 1300 lux ) y otro en luz roja, obteniéndose de ésta forma un cultivo completamente desdiferenciado y de crecimiento rápido.

#### EFFECTO DE LONGITUD DE ONDA EN EL ASPECTO Y CRECIMIENTO DEL CULTIVO:

##### a) Luz roja:

Se obtuvo un cultivo homogéneo desdiferenciado, de consistencia suave, de color blanco y de crecimiento rápido ( fig. 4) que al secarse adquiría una coloración amarillo claro y con textura quebradiza.

##### b) Luz blanca:

Se obtuvo un cultivo desdiferenciado, de consistencia -- suave color verde, con frecuente aparición de partes oscuras



y de crecimiento más lento que en condiciones de luz roja (fig. 5) al secarse éste tejido adquiere una coloración verde claro y con puntos negros, y tiene una textura quebradiza.

Se determinó la curva de crecimiento en peso fresco y peso seco para las células crecidas en condiciones de luz roja en medio de cultivo ANA<sub>5</sub>BA<sub>9</sub> y a 28°C , obteniéndose un máximo del crecimiento a los 34 días para peso fresco de 14.7 gramos y de 0.57 grs. para el peso seco ( fig. 3 , tabla #1).

CUANTIFICACION DE SARSASAPOGENINA Y COLESTEROL EN LOS  
CULTIVOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES:

Con el fin de determinar la concentración de sarsasapogenina y colesterol en los cultivos, fué necesario determinar las curvas patrón para ambos compuestos, las tablas No. 2 y 3 muestran la relación que existe entre la altura del pico en el cromatograma y la cantidad del compuesto correspondiente ( sarsasapogenina ó colesterol ).

Con el objetivo de saber sí nuestro método de cuantificación de sarsasapogenina podía resolver eficientemente una mezcla de colesteroly de sarsasapogenina, se inyectó al cromatografo una muestra que contenía éstos dos compuestos. La fig. 6 muestra la resolución obtenida para éstas muestras.

Otro dato necesario fué conocer la eficiencia del método de extracción, por lo cual se hicieron dos controles:

1. Utilizando tejido desdiferenciado de jitomate
2. a partir de semilla madura de Yucca filifera

En el primer caso, como ya se mencionó en la metodología se utilizó para conocer el porcentaje de recuperación, obteniéndose en éste punto 82.3 % de la sarsasapogenina adicionada al tejido de jitomate, lo que nos demuestra que nuestro metodo de extracción es aceptable, es decir que no se pierden cantidades considerables de producto en el transcurso de la extracción.

El cromatograma obtenido para ésta muestra ( control 1 ) nos da a conocer la presencia de dos picos: uno que corresponde a la sarsasapogenina y el otro no identificado; se podría suponer que corresponde a la tomatidina ( Roddick, J.G. y col. 1972).

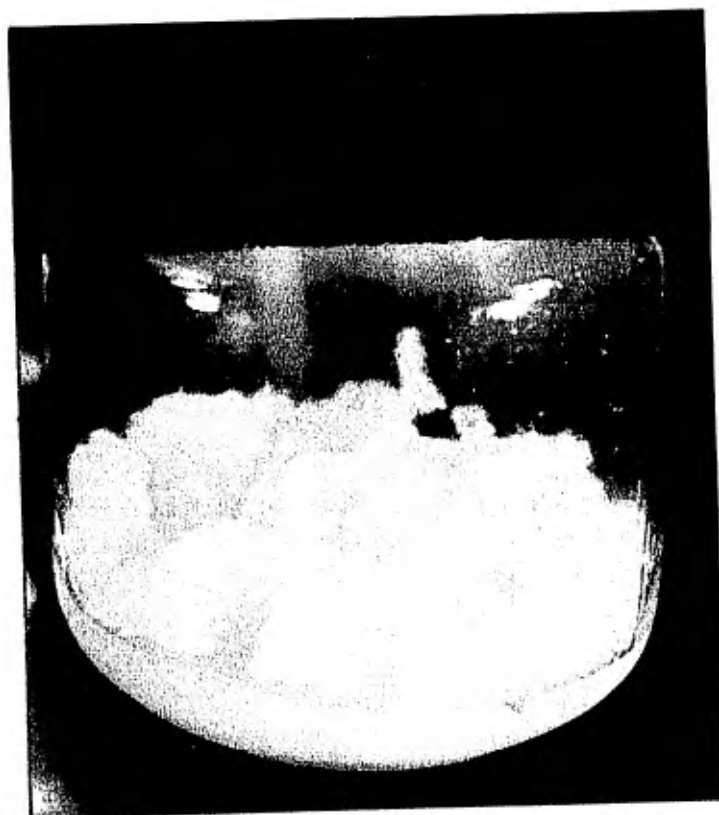


Fig. No. 4 Aspecto del tejido crecido bajo condiciones de Lux Roja, a 28°C y en medio de cultivo ANA<sub>5</sub>BA<sub>9</sub>

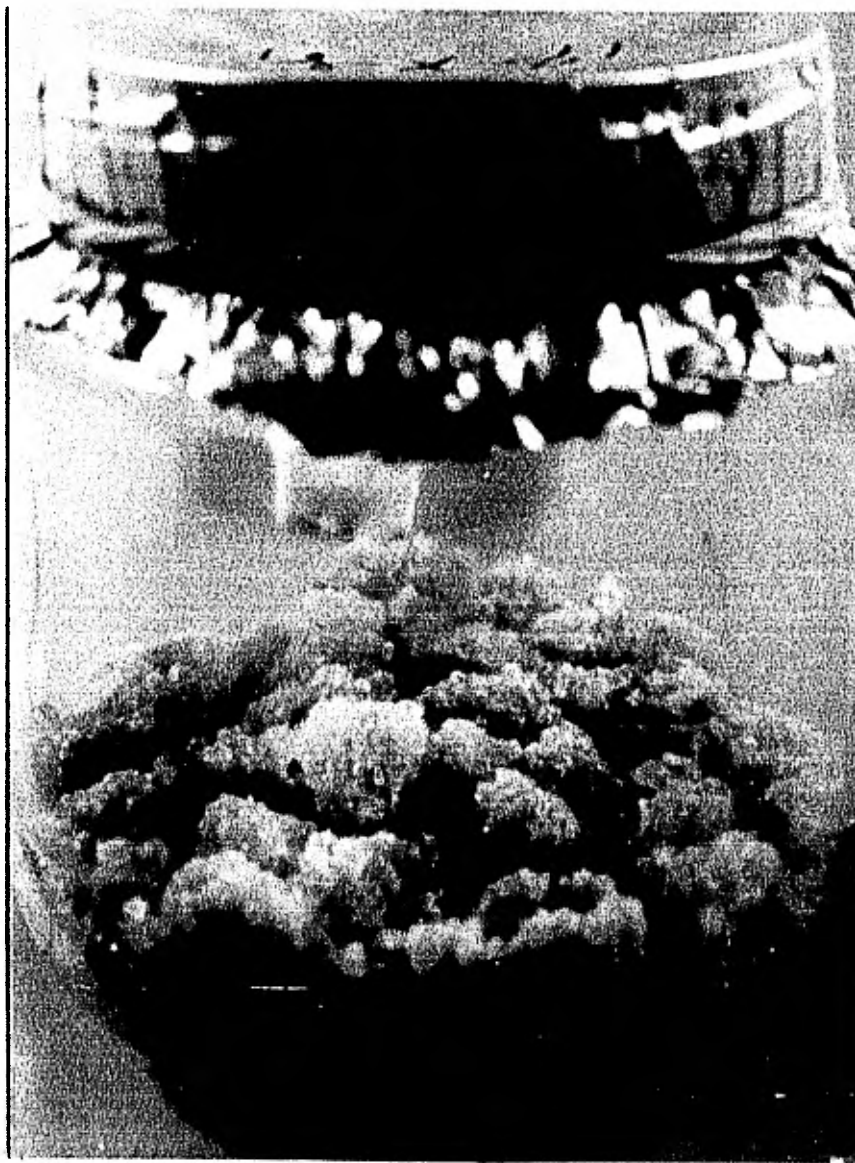


Fig. No. 5 Aspecto del tejido cultivado bajo condiciones de Luz Blanca, a 28°C y en medio de cultivo ANA<sub>5</sub>BA<sub>9</sub>

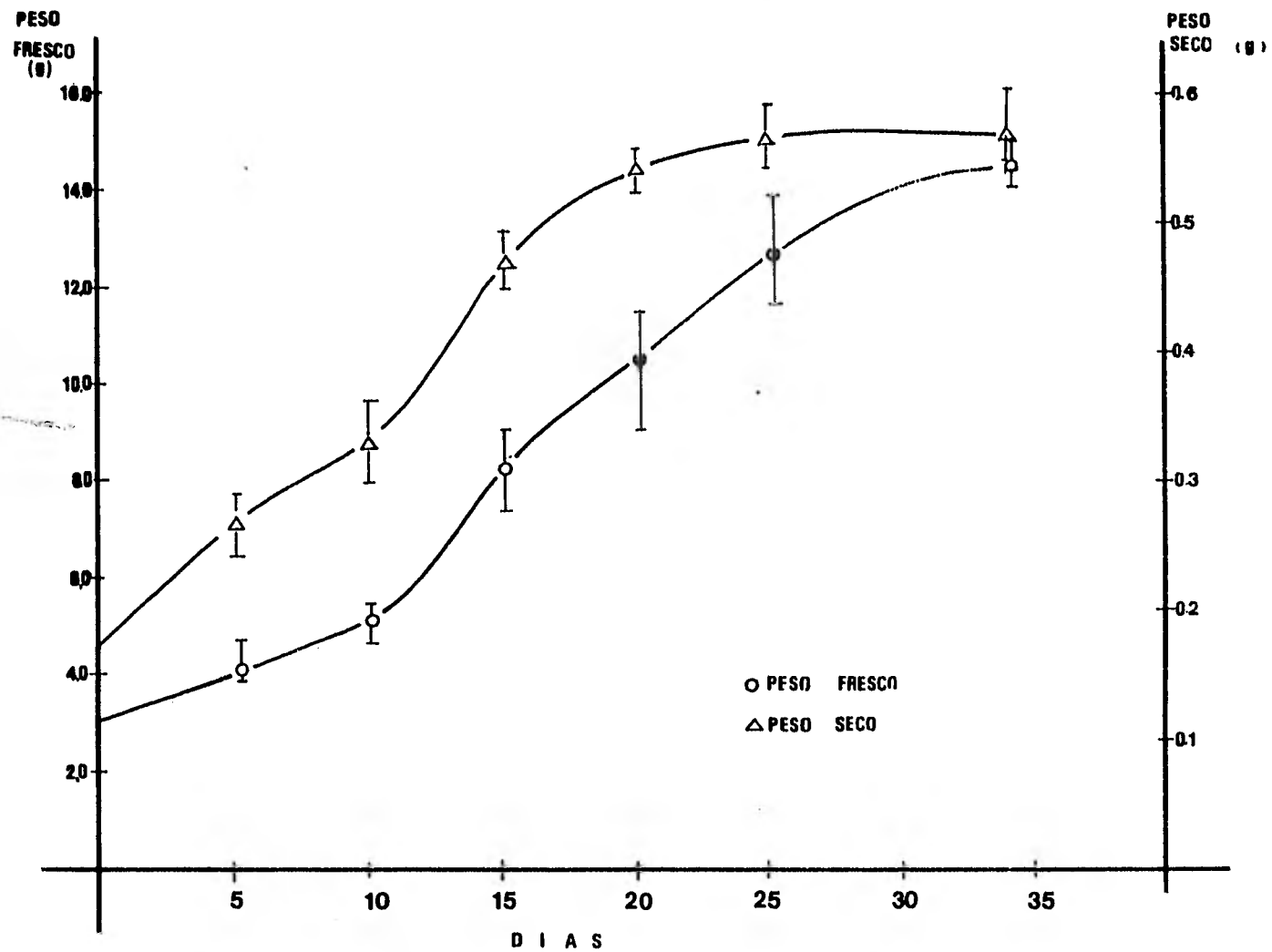


Fig. No. 3 Ciclo de crecimiento para células de *Yucca filifera*, crecidas en medio de cultivo ANA<sub>5</sub>BA<sub>9</sub>

Tabla No. 1 Ciclo de crecimiento para células de Yucca filifera, crecidas en medio de cultivo ANA<sub>5</sub>BA<sub>9</sub>

Días de crecimiento	Peso Fresco ( g )	Desviación estándar	Peso seco ( g )	Desviación estándar
0.0	3.0	0.0	0.17	0.0
5.0	4.4	0.399	0.27	0.015
10.0	5.2	0.533	0.33	0.035
15.0	8.4	0.933	0.47	0.030
20.0	10.4	1.333	0.54	0.015
25.0	12.9	1.060	0.56	0.025
34.0	14.7	0.399	0.57	0.046

\* Los resultados son promedio de cinco determinaciones.

Tabla No. 2 Curva de calibración para sarsasapogenina por cromatografía de gases.

---

Volumen de inyección:		Sarsasapogenina ( ug )	Altura de pico ( cm )
1.5	ul	0.9	2.4
2.0	ul	1.2	3.3
2.5	ul	1.5	5.0
3.0	ul	1.8	6.0

---

\*Las alturas obtenidas son el promedio de inyectar las muestras por duplicado.

Tabla No. 3 Curva de calibración para el colesterol por cromatografía de gases.

Volumen de inyección:		Colesterol ( ug )	Altura de pico ( cm )
1.5	ul	1.8	8.5
2.0	ul	2.4	11.2
2.5	ul	3.0	16.7
3.0	ul	3.6	19.9

\* Las alturas obtenidas son el promedio de la inyección de las muestras por duplicado.



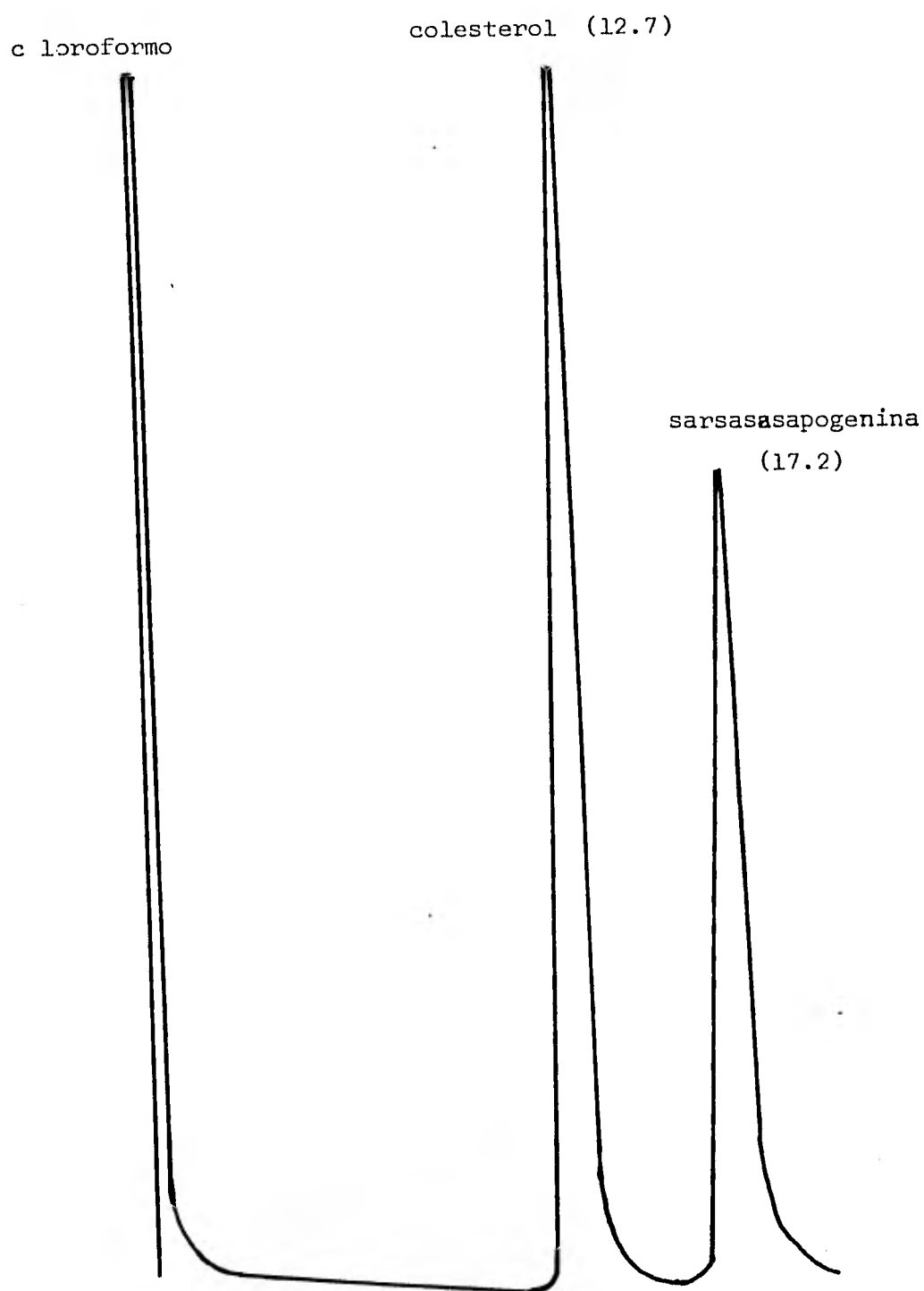


Fig. No. 6 Cromatograma de una muestra que contiene colesterol y sarsasapogenina. Se utilizó cloroformo.

La identificación del pico que corresponde a la sarsasapogenina, se hizo agregando más sarsasapogenina al extracto que se va a inyectar al cromatógrafo y observando en el cromatograma cual es el pico que crece.

En el segundo control ( semilla molida de Y. filifera.) utilizado para comprobar la eficiencia del método, se obtuvo 8.1% de sarsasapogenina peso seco, por lo que se asegura que el método de extracción de éste producto y la manera de cuantificarlo son eficientes, ya que la cantidad de sarsasapogenina que se ha reportado presente en semillas maduras de Y. filifera es del orden de 8.0 % peso seco.

ANALISIS DE LA FRACCION HEXANICA ANTES DE HIDROLISIS :  
( FRACCION HEXANICA I ).

1. Se cuantificó la cantidad de aceites en función del ciclo de los cultivos crecidos en el medio ANA<sub>5</sub>BA<sub>9</sub>, a 28°C y bajo condiciones de luz roja, para saber en que etapa se producía la mayor cantidad de éstos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 4, y fig. No. 7, donde se puede observar que la mayor cantidad de aceites es producida a los 22 días de crecimiento, tiempo que corresponde a la fase estacionaria en el ciclo de crecimiento celular.

Observaciones hechas al principio de éste trabajo nos mostraron de manera cualitativa que la cantidad de aceites en los cultivos está relacionada con el grado de desdiferenciación celular y aspecto del tejido, ya que se detectaron cantidades más altas de aceites ( no reportadas en éste trabajo) en cultivos menos desdiferenciados y de crecimiento lento.

II. Se cuantificó la sarsasapogenina y el colesterol en el cultivo de células en función de su ciclo de crecimiento, - crecidas en las mismas condiciones citadas para la cuantificación de aceites.

La razón por la que se determinó el colesterol y la sarsasapogenina en los extractos hexánicos antes de hidrólisis fué con el fin de identificar si existían el colesterol y la sarsasapogenina en forma libre, es decir, no en forma glucosilada. Los resultados se muestran en la tabla No. 5 fig. # 8.

#### FRACCION HEXANICA DESPUES DE HIDROLISIS ( Fraccion II ):

I. Se cuantificó la sarsasapogenina y el colesterol en cultivos crecidos en el medio de cultivo ANA<sub>5</sub>BA<sub>9</sub>, a 28° C y bajo luz roja. Con éstos resultados se demuestra que también existe colesterol y sarsasapogenina de manera glucosilada, como se puede apreciar en la tabla No. 6 fig. No. 9.

Analizando la fig. No. 8 podemos observar que en el momento en que se dispara la síntesis de colesterol ( 20 días ) se inicia la síntesis de sarsasapogenina, éstos resultados nos sugieren que el colesterol actúa como precursor de ésta última, hecho que se ratifica si analizamos ahora la fig. 9, en la que se puede ver que a un aumento en la cantidad de - - sarsasapogenina le corresponde una disminución en la cantidad de colesterol.

Un estudio por medio del cual podríamos saber con certeza si el colesterol actúa o no como precursor en la síntesis de sarsasapogenina, sería utilizando colesterol marcado radioactivamente, en los cultivos e identificar sarsasapogenina marcada en los extractos hexánicos correspondientes.

Tabla No. 4. Contenido del porcentaje de los aceites en el cultivo de células de Yucca Filifera en función del ciclo del crecimiento celular.

Medio de cultivo:	Días de crecimiento	Aceites ( % )	Desviación estándar :
ANA <sub>5</sub> BA <sub>9</sub>	5.0	0.34	0.026
idem.	15.0	0.38	0.020
idem.	20.0	0.46	0.020
idem.	22.0	1.20	0.020
idem.	34.0	1.28	0.050

Se incubaron 3.0 g. de tejido desdiferenciado en el medio de cultivo indicado, en condiciones de luz roja y a 28°C

Los resultados son promedio de 3 determinaciones para cada tiempo.

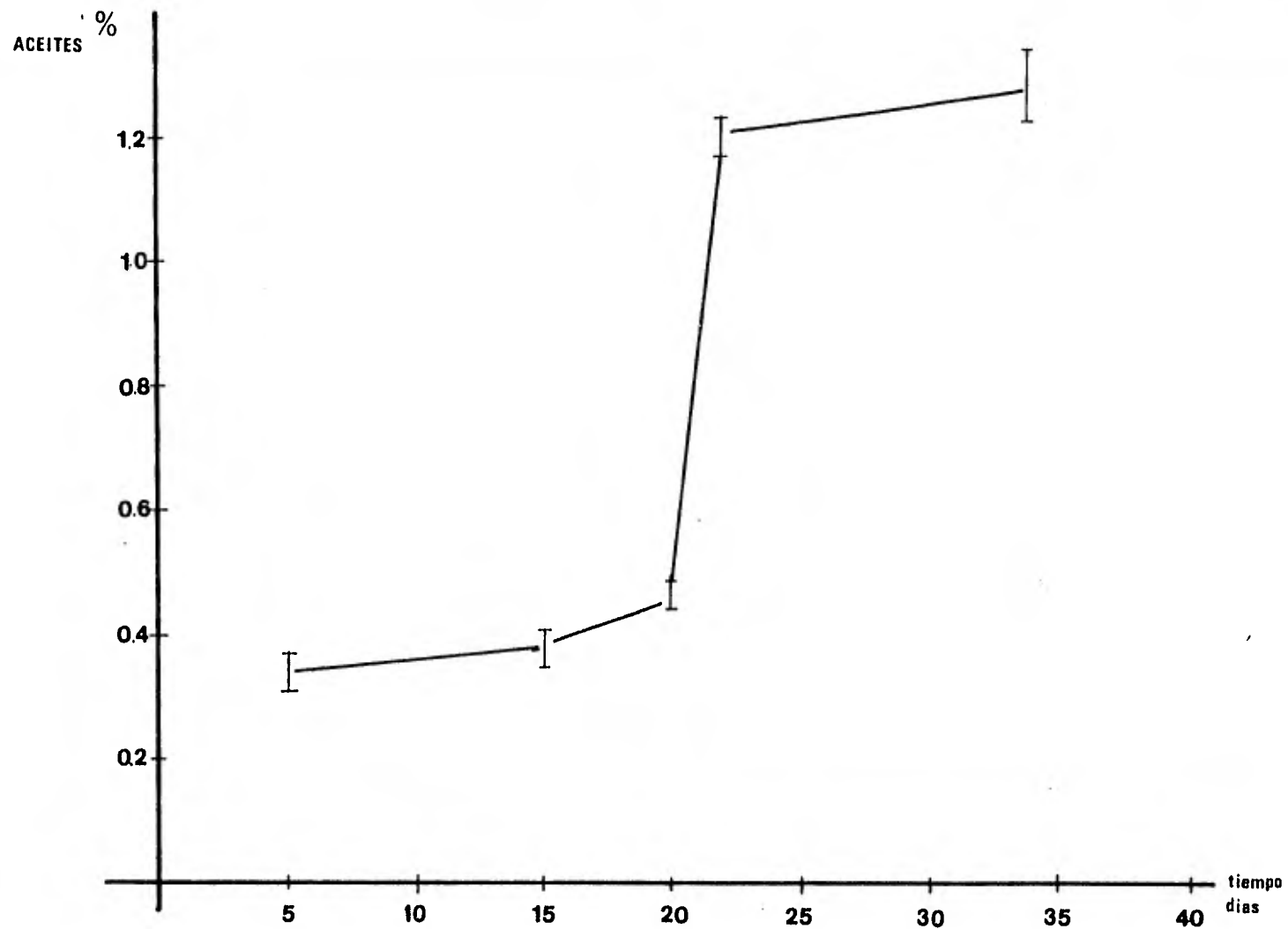
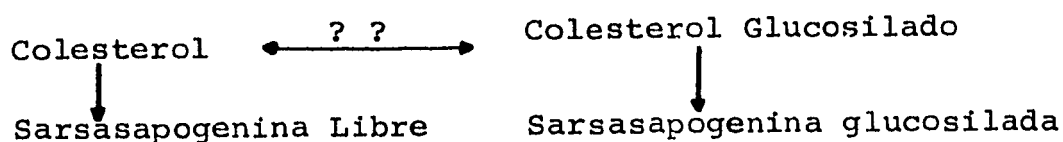


Fig. 7 Contenido de aceites en cultivo de células de *Yucca filifera* en función del ciclo de crecimiento del cultivo.

Con el objetivo de ver cuales son las cantidades totales de sarsasapogenina y colesterol existentes en los cultivos , se sumaron los resultados obtenidos de éstos compuestos tanto en su forma libre como en su forma glucosilada. Los resultados se muestran en la tabla No. 7 y fig. 10.

En base a todo lo anterior se podría plantear lo siguiente:



Analizando la figura No. 11, en la que se puede observar la relación que existe entre la cantidad de sarsasapogenina libre y la sarsasapogenina glucosilada, se desprende que la molécula glucosilada pasa de saponina a sapogenina, a los 22 días de la incubación celular.

Haciendo el mismo análisis para la molécula del colesterol, ( fig. No. 12 ), podría pensarse que hay una pequeña transformación de colesterol libre a glucosilado, aparentemente, en el momento en que desciende la síntesis del colesterol libre, también se observa un ligero decremento en el colesterol glucosilado.

Tabla No. 5 Contenido de colesterol y sarsasapogenina en un cultivo de células de Y. filifera en función del ciclo de crecimiento. Fracción hexánica I. ( antes de hidrólisis).

Días crecimiento	Sarsapogenina mg/100 g. peso seco	Des..St.	Colesterol mg/100 g peso seco	Des.St.
5.0	0.0	0.0	0.0	0.0
15.0	0.0	0.0	2.3	0.133
20.0	0.0	0.0	11.2	1.200
22.0	6.9	0.133	3.8	0.166
34.0	5.1	0.266	3.2	0.133

Se incubaron 3.0 g. de tejido desdiferenciado en medio de cultivo ANA<sub>5</sub>BA<sub>9</sub> , en condiciones de luz roja y a 28°C.

Los resultados son promedio de 3 determinaciones, para cada tiempo

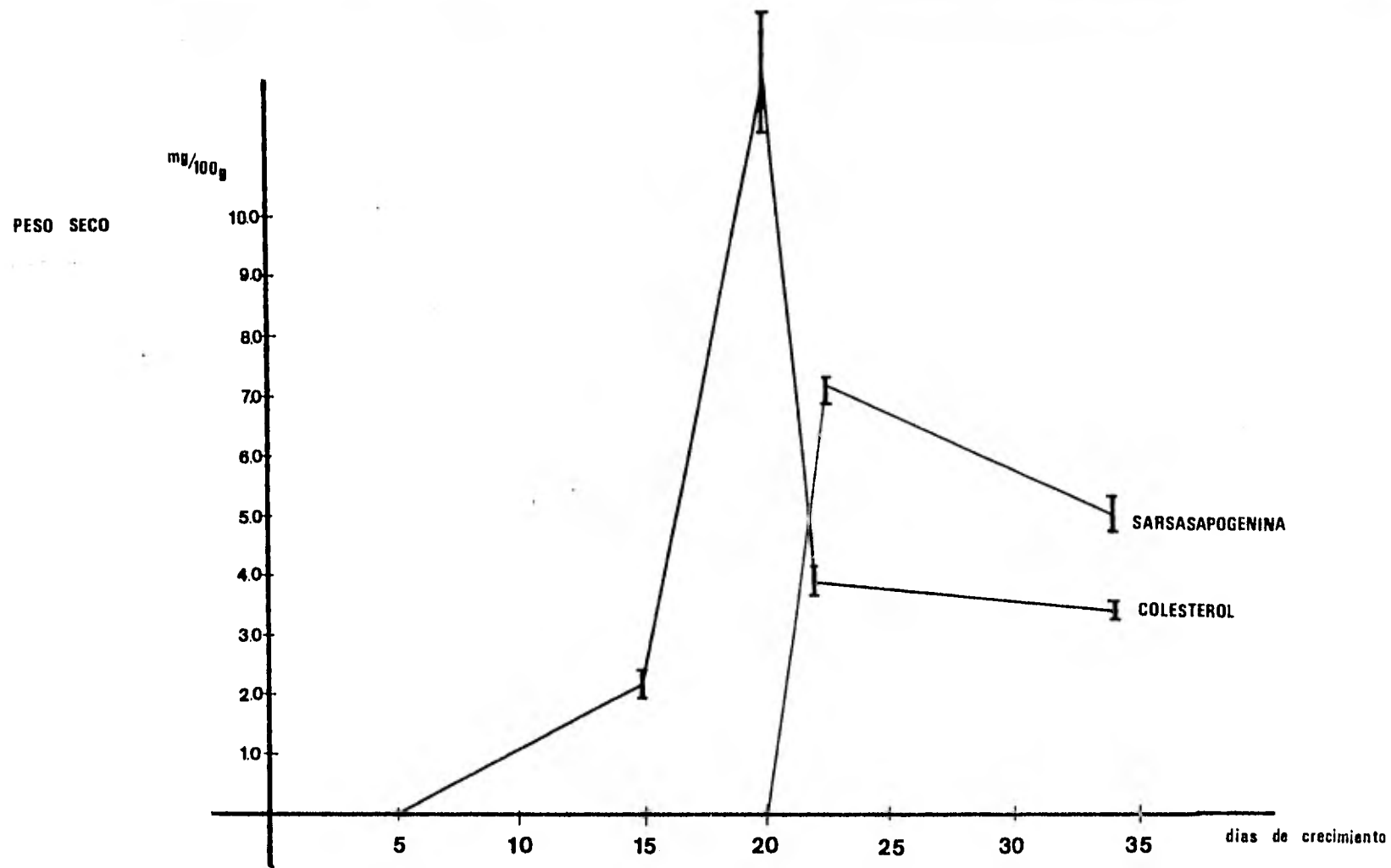


Fig. No. 8 Contenido de colesterol y sarsasapogenina en cultivo de tejidos de Y. filifera en función del tiempo de incubación.  
Extractos hexánicos I. ( antes de hidrólisis ).



Tabla No. 6 Contenido de colesterol y sarsasapogenina en cultivo de células de Y. filifera en función del ciclo de crecimiento. Fracción hexánica II. (después de hidrólisis).

Días de crecimiento	Sarsasapogenina		Des. St.	Colesterol		Des. St.
	mg/100 g. peso	seco		mg/100g peso	seco	
5.0	6.51		0.45	6.15		0.30
15.0	8.20		0.053	5.60		0.10
20.0	8.40		0.300	5.50		0.20
22.0	4.80		0.130	4.00		0.20
34.0	5.90		0.230	4.10		0.10

Se incubaron 3.0 g. de tejido desdiferenciado de Y. filifera en medio de cultivo ANA<sub>5</sub>BA<sub>9</sub>, en condiciones de luz roja y a 28°C.

Los resultados son promedio de tres determinaciones para cada tiempo.

mg/100 g.

Peso seco.

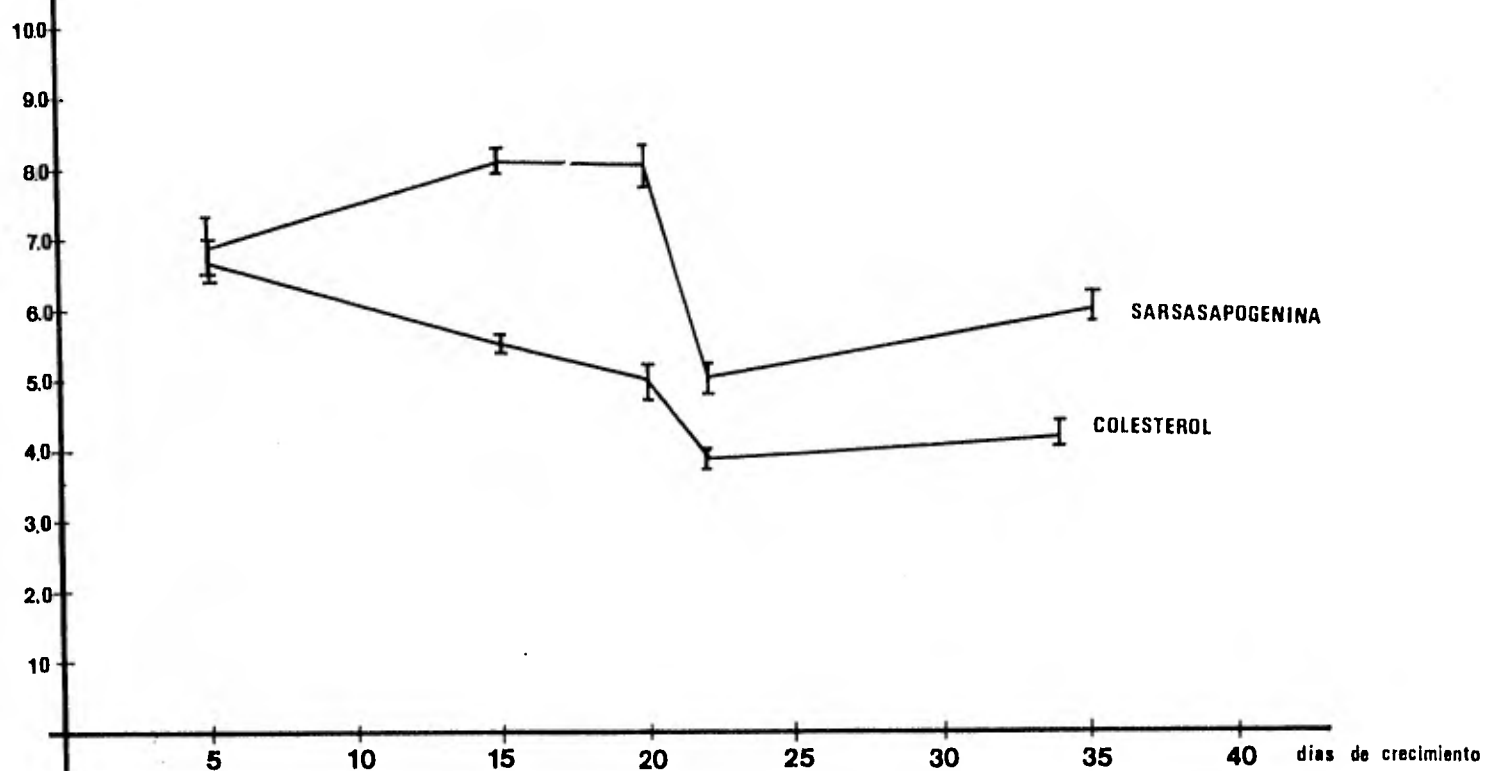


Fig. No. 9 Contenido de colesterol y sarsasapogenina en cultivos de Y. filifera en función del tiempo de incubación.  
Extractos hexánicos II. ( después de hidrólisis )

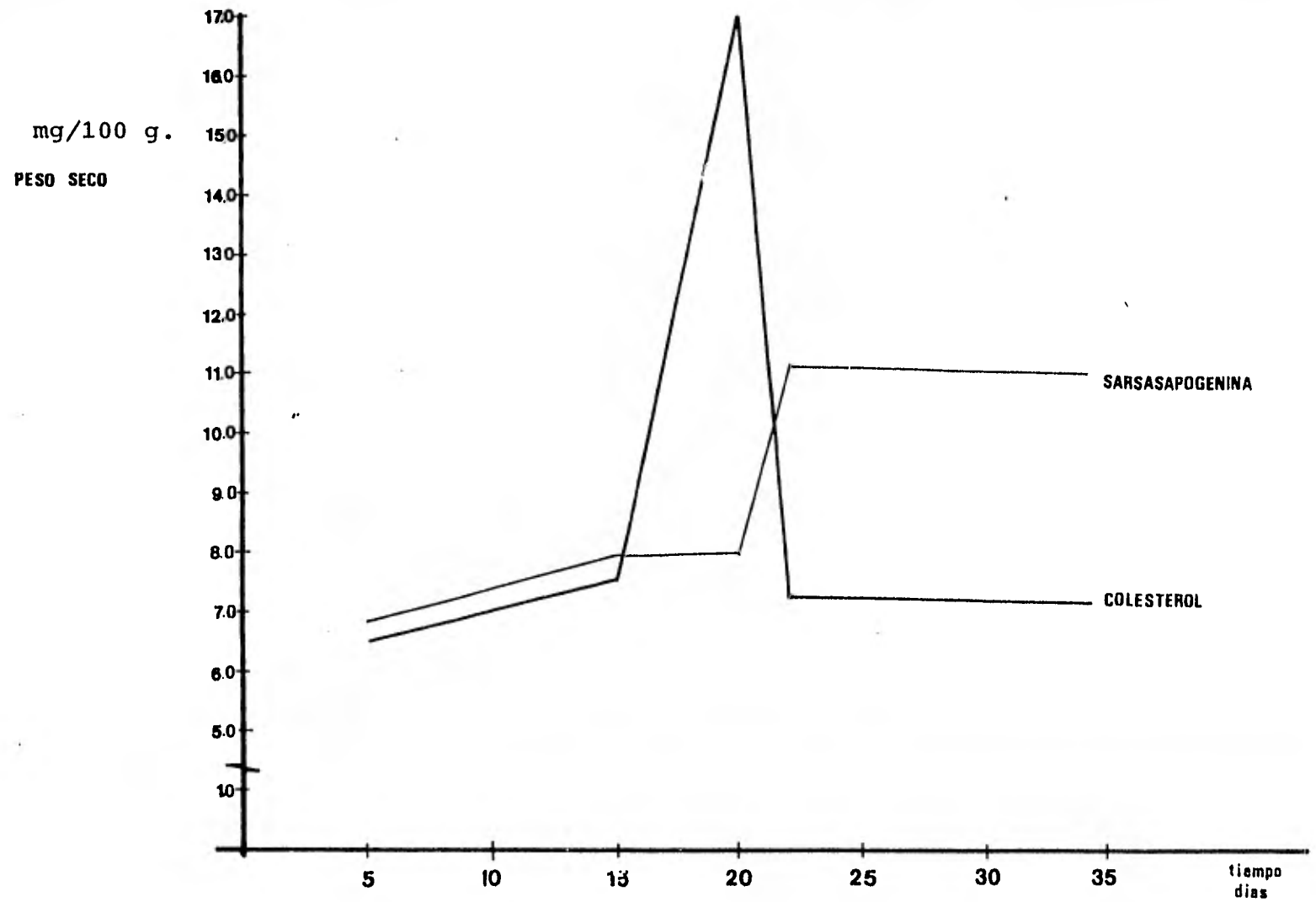


Fig. No. 10 Contenido total de colesterol y sarsasapogenina (glucosilado y libre), en cultivo de tejidos de Y. filifera en función del tiempo de incubación.

Tabla No. 7 Contenido Total de Colesterol y sarsasapogenina en cultivo de células de *Y. Filifera* en función del ciclo de crecimiento.

Días de crecimiento	Sarsasapogenina mg/100 g. peso seco	Colesterol mg/100 g. peso seco
5	6.51	6.15
15	8.20	7.90
20	8.40	16.50
22	11.70	7.80
34	11.00	7.30

Se incubaron 3 g. de tejido desdiferenciado en medio de cultivo ANA<sub>5</sub>BA<sub>9</sub>, en condiciones de luz roja y a 28°C, se utilizó cultivo de 46 resiembras.

Los resultados son promedio de 3 determinaciones, para cada tiempo.

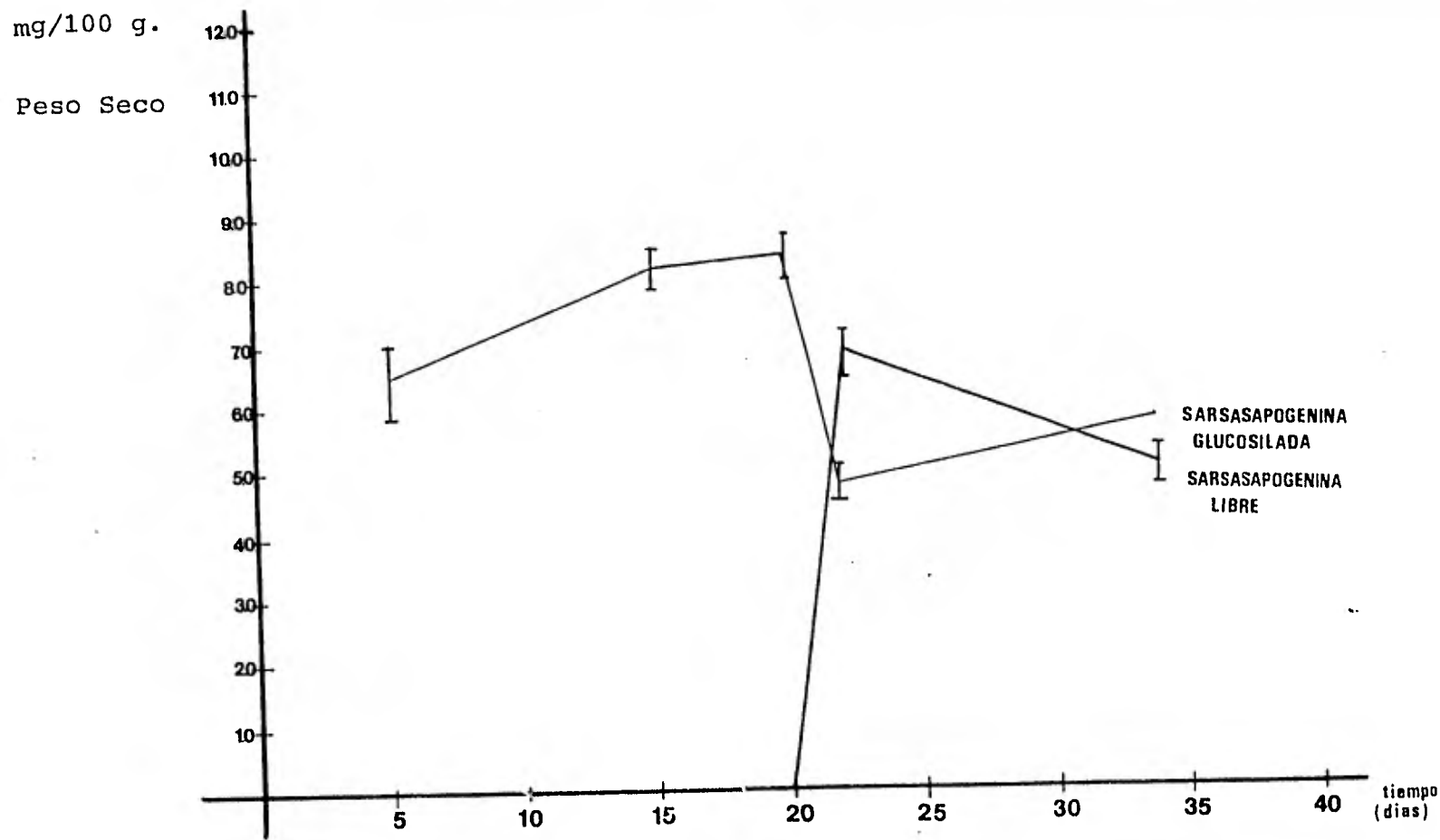


Fig. No. 11 Relación entre la cantidad de sarsasapogenina glucosilada y la sarsasapogenina libre.

mg/100 g.

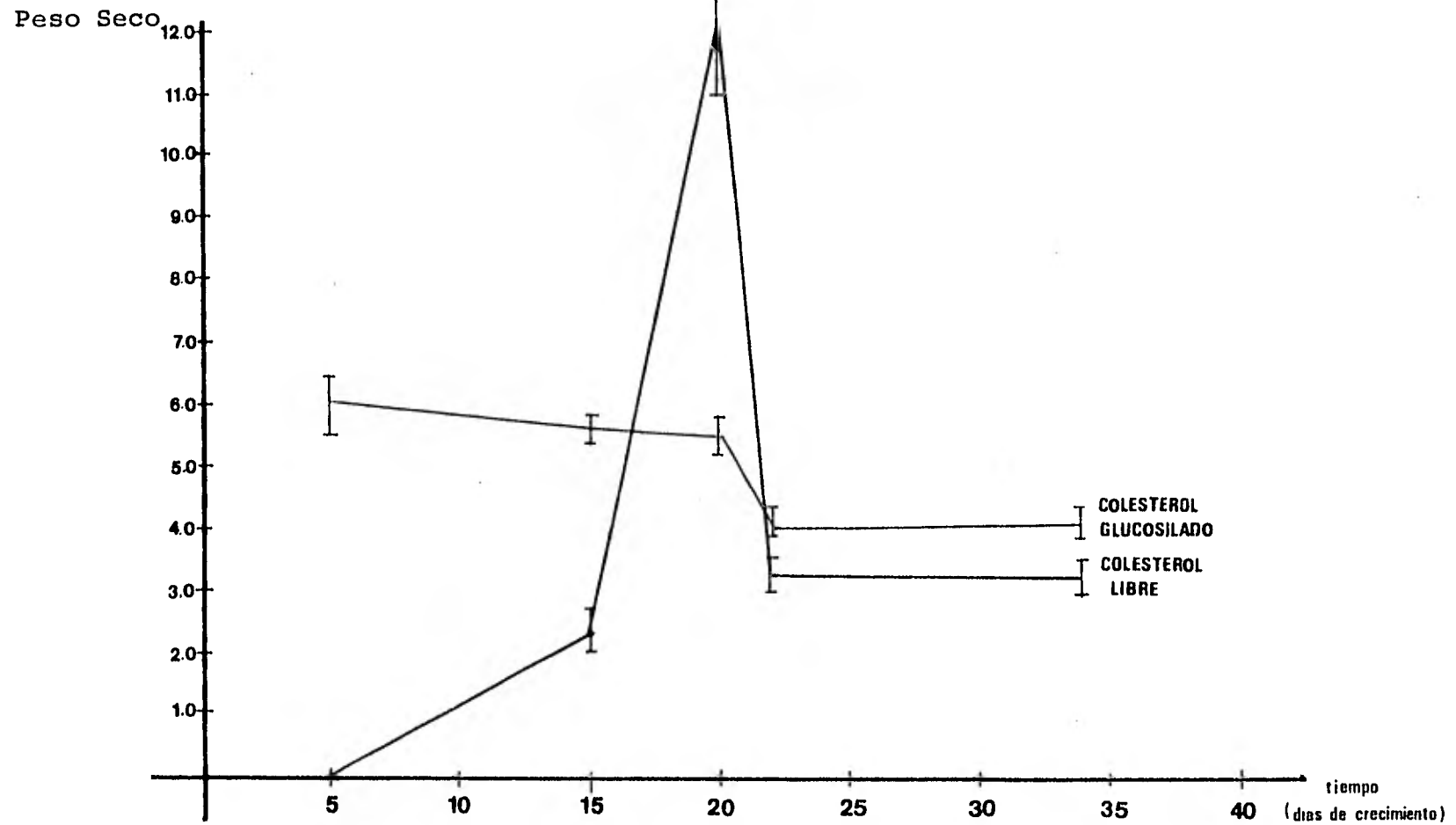


Fig. No. 12 Relación entre la cantidad de colesterol glucosilado y el colesterol libre

EFFECTO DEL COLESTEROL EN LA PRODUCCION DE  
SARSASAPOGENINA.

En relación al aumento de la sarsasapogenina utilizando como precursor de su síntesis colesterol, nos enfrentamos al problema de la solubilidad de éste. La solubilidad reportada para el colesterol es de 2 mg/l en agua. Kaul y col. -- ( 1969 ), han reportado la utilización de colesterol como precursor de la diosgenina en cultivo de células de Dioscorea destoides, solubilizándolo en etanol, no habiendo encontrado éstos autores problemas de toxicidad.

Sin embargo, en nuestro caso el etanol agregado a los cultivos resultó tóxico. También se intentó la utilización de otros compuestos para aumentar la solubilidad del colesterol, tales como, dioxano, acetato de etilo y extracto de levadura ( Marshall J. and John Staba 1976 ), y en todos los casos los cultivos morían.

Algunos autores han reportado que el colesterol influye en el crecimiento ( Jna M. C. 1978 ). Se intentó un experimento del efecto del colesterol a la concentración óptima de solubilidad en agua en el medio de cultivo, encontrándose en éste caso un aparente mayor crecimiento, el cuál fué medido ( fig. No. 13 y tabla No. 8 ), con ello se demuestra que no hay efecto del colesterol sobre el crecimiento del cultivo.

En cuanto a la influencia del colesterol en el contenido de la sarsasapogenina, no se puede concluir nada, ya que únicamente se hizo un experimento preliminar. En el futuro será necesario, como primer paso, formar un derivado de colesterol con mayor solubilidad en medio acuoso; utilizar <sup>14</sup>C-colesterol- derivado y demostrar su incorporación dentro de la célula y/o su incorporación a la molécula de sarsasapogenina.

Peso Fresco  
( g )

Peso Seco  
( g )

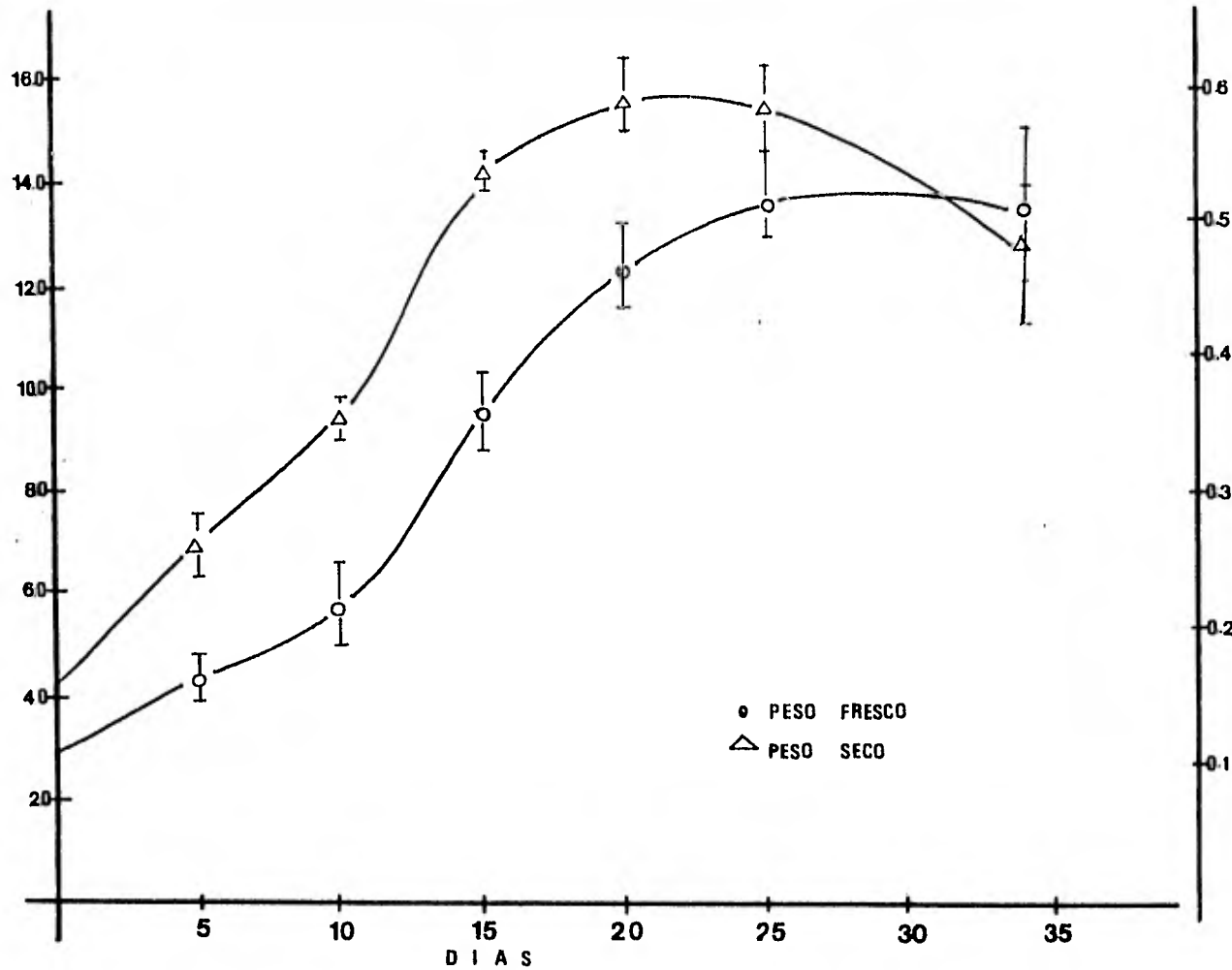


Fig. No. 13, Ciclo de crecimiento para células de Y.filifera crecidas en medio de cultivo ANA<sub>5</sub>BA<sub>9</sub> más colesterol al 0.02%.



Tabla No. 8 Ciclo de crecimiento para células de Yucca filifera, crecidas en medio de cultivo ANA<sub>5</sub>BA<sub>9</sub> más coles<sub>terol</sub> al 0.02%.

Días de crecimiento	Peso fresco (g)	Desviación estándar	Peso seco (g)	Desviación estándar
0.0	3.0	0.0	0.15	0.0
5.0	4.4	0.533	0.26	0.02
10.0	5.9	0.799	0.35	0.015
15.0	9.5	1.333	0.53	0.015
20.0	12.4	0.933	0.58	0.020
25.0	13.9	0.799	0.58	0.030
34.0	13.6	1.500	0.47	0.050

Los resultados son promedio de 5 determinaciones.

#### IV. C O N C L U S I O N E S .

1. Se determinó que para la planta Yucca filifera, el empleo de medios de cultivo enriquecidos con extracto de levadura o hidrolizado de caseína, resultan inadecuados tanto para la inducción del callo como para la propagación del mismo, debido a que los cultivos producen pigmentación oscura, y posteriormente mueren.
2. Las condiciones de incubación, luz blanca y luz roja ocasionan efectos en el aspecto del tejido obteniéndose mejores cultivos cuando se utilizan condiciones de luz roja.
3. La técnica de cromatografía de gases utilizada para la cuantificación de sarsasapogenina demostró ser eficiente y específica.
4. El contenido de aceites más alto se obtuvo a los 22 días de crecimiento celular, siendo éste de 1.2% peso seco, a partir de un cultivo crecido en medio ANA<sub>5</sub>BA<sub>9</sub>, a 28 C y luz roja.
5. Se encontró que existe tanto colesterol libre como sarsasapogenina libre en la fracción de aceites aislada, (fracción hexánica I.)
6. Se encontró que los cultivos de células de Yucca filifera contienen colesterol glucosilado y sarsasapogenina glucosilada en 5.6 mg/100 g. y 8.4 mg/100 g. peso seco.
7. El contenido total de sarsasapogenina se encontró a los 22 días de crecimiento, siendo ésta de 11.7 mg/100 g. peso seco.

8. En las condiciones de nuestros experimentos, el colesterol adicionado al medio de cultivo no mostró ningún efecto en el crecimiento celular y la producción de sarsapogenina.

B I B L I O G R A F I A .

## B I B L I O G R A F I A .

1. Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H.  
Plant Tissue Culture and Bio-Technological Application  
Proceeding of the first international congress on medical  
plant.  
Held at the University of Munich, Germany.  
Springer Verlag-Berlin Heidelberg New York ( 1977 ).
2. Constable, F., Shyluk, J., Gamborg, O.  
The effect of hormones on anthocyanin accumulation in cell  
cultures of Haplopappus gracilis.  
Planta ( Berl ) 96, 306-316 ( 1971 ).
3. Chatuvedi, H. C. , Scrivastava, S. N.  
Diosgenin Biosynthesis by Tuber Callus Cultures of  
D. deltoidea.  
Lloydia 28, ( 1964 ).
4. Heftman, E.  
Biosynthesis of steroids.  
Lloydia, 31, No. 4 ( 1976 ).
5. Chan, W. N., Staba E. J.  
Production of tropane alkaloids by Datura tissue culture  
Lloydia 28, ( 1964 ).
6. Jan M. C. Genus  
Steroid Hormones and Plant Growth and Development (Review)  
Phytochemistry, Oct. 1978.
7. Kaul, B. , Stohs, Staba, S. J.  
Dioscorea Tissue Culture III. Influence of various factors  
on Diosgenin production by D. deltoidea callus and suspen-  
sion cultures.
8. Marshall, Jo. G. Staba, J.  
Steroids and artifact from D. deltoidea tissue cultures  
Lloydia 39, No. 1 ( 1976 ).
9. Misawa, M. Hayashi, M. Shimada, K. Omotani, Y.  
Prevention and cure of Coccidium Diseases.  
Japan Patent Appl. No. 50-101510 ( 1975 )
10. Mitsuoka, S., Nishi, T.  
Production of a pigments by Mallotus Japonicus Tissue  
culture.  
Japan Patent (kokai) 74-94897 ( 1974 ).

11. Mizusaki, S., Tanaba, Y., Noguchi, M. Tamaki, E.  
P-coumaroyl putrescine, caffeoyl putrescine and feruloyl  
putrescine from callus tissue culture of Nicotiana Tabaccum  
Phytochemistry 10, 1347-1350 ( 1971 ).
12. Murguia, A. F.  
Contribución al estudio de la palma china ( Yucca australis)  
en Coahuila.  
Tesis Profesional. Universidad de Coahuila.  
Buenavista, Coah. ( 1959 )
13. Radwan, S. S., Mangold, H.K.  
The Lipids in Plant Tissue Culture  
Advances in Lipid Research  
Academic Press XIV 171-211 ( 1976 )
14. Murashige, T. , Skoog, F.  
A revised medium for rapid growth and bio-assays with  
Tobacco tissue cultures.  
Physiologia Plantarum 15: 473-495 ( 1962 )
15. Reinert, J., Bajaj, P. S.  
Plant Cell, Tissue and Organ Culture  
Springer - Verlag  
Berlín Heidelberg New York ( 1977 )
16. Roddick, J. G., Bucher, D. N.  
Isolation of Tomatina form Culture Exiced roots and Callus  
Tissue of Tomato.  
Phytochemistry 11: 2019 ( 1972 )
17. Romo de Vivar, A., Arreguir, B., Camacho, R., Guerrero, G.,  
Ortega, A., Castillo, M.  
Contenido esteroideal de Yucca Filifera, Aislamiento de las  
filiferinas ( saponinas esteroideales).
18. Rosas, R. V.  
Estudio de los esteroides en semillas y en cultivo de te-  
jidos de Yuccas.  
Tesis Profesional. Universidad Veracruzana.  
Orizaba, Ver. ( 1979 ).
19. Song., M. and Tattrie, N.H.  
Changes in lipid contents on suspension cultures of  
Morning glory.  
Can J. Bot. 51 1893 ( 1973 ).
20. Stickland, R.G., Suderland, N.  
Photocontrol of growth, and of anthocyanin and Chlorogenic  
Acid, and production in culture callus tissu of Haplopappus  
gracilis.  
Ann. Botany 16, 671-685 ( 1972 ).

21. Stoller, E. W. Stohs, S. J.  
Fatty acid composition of lipid of Corchorus, Yucca,  
Dioscorea, Whithania and Rives. tissue cultures.  
Lloydia 37, 309-312 ( 1974 )
22. Stohs, S. J. , Kaul, B., Staba, E. J.  
The metabolism of  $^{14}\text{C}$ -Cholesterol by Dioscorea deltoidea  
suspension cultures.  
Phytochemistry 8, 1679-1686 ( 1969 ).
23. Stohs, S. J. , Rosenberg, H.  
Steroids and Steroid Metabolism in Plant Tissue Cultures  
Lloydia 38, No. 3 ( 1975 )
24. Stumpf, P, K., Weber, N.  
The metabolisim of fatty acids by soybean suspension  
cultures  
Lipids(in press ) 1977 )
25. Tabatta, M., Yamamoto, H., Hiraoka, N.  
Regulation of Nicotine Production in Tobacco tissue culture  
by plant growth regulators.  
Phytochemistry 10, 723-729 ( 1971 )
26. Yamada, Y.  
Tissue culture studios on cereals  
Plant cell, tissue culture, and organ culture  
Edited by Reinjard J. and Bajaj, P. S.  
Springer-Verlag.  
Berlin Heidelberg New York ( 1977 ).
27. Yoshikawa, K., Suzuki, M., Muruoka, M.  
Production of Rauwolfia alkaloids. Japan.  
Patent (kokai) 73-80789 (1973).